

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

25.04.96

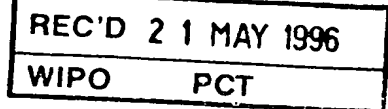
日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 5 年 3 月 2 0 日



出 願 番 号
Application Number:

平成 7 年特許願第 0 8 7 4 2 0 号

出 願 人
Applicant (s):

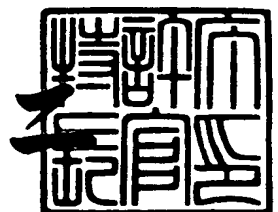
住友電気工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1 9 9 6 年 4 月 1 2 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

清 川 佑



出証番号 出証特平 0 8 - 3 0 2 1 1 3 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 94YA0288

【提出日】 平成 7年 3月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 15/28

【発明の名称】 F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体
及びその製造方法

【請求項の数】 11

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部免疫学
 教室内

 【氏名】 榎垣 伸彦

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部免疫学
 教室内

 【氏名】 八木田 秀雄

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部免疫学
 教室内

 【氏名】 奥村 康

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会
 社横浜製作所内

 【氏名】 中田 元巳

【特許出願人】

 【識別番号】 000002130

 【氏名又は名称】 住友電気工業株式会社

 【代表者】 倉内 憲孝

【代理人】

【識別番号】 100093528

【弁理士】

【氏名又は名称】 西川 繁明

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証の写 5

【包括委任状番号】 9003720

【書類名】 明細書

【発明の名称】 F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項2】 F a s リガンドの種がヒトである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項3】 F a s リガンドの種がマウスである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項4】 マウス起源のモノクローナル抗体である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項5】 F a s リガンドとF a s との生理的反応を阻害することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項6】 (1) 動物を、F a s リガンドを発現させたC O S細胞で免疫感作する、(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する、(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、F a s リガンドを発現させたC O S細胞の上清中に存在するF a s リガンドによるF a s 発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、(6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする、(7) 所望の抗体を分泌しているクローンを選択する、(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する、(9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含むことを特徴とするF a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項7】 動物が、MRL lpr/lprマウスに属する齧歯類動物である請求項6記載の製造方法。

【請求項8】 ミエローマ細胞が、P3X63Ag8.653である請求項6記載の製造方法。

【請求項9】 細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項10】 Fasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、溶液中のFasリガンドを検出する方法。

【請求項11】 Fasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせるFasリガンド検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、Fasリガンドの検出方法、及びFasリガンドを検出するためのキットに関する。また、本発明は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。本発明のモノクローナル抗体は、細胞死におけるFasシステム等の解明、免疫治療や診断、Fasリガンドの検出、これらに関連した産業分野において有用である。

本発明において、活性フラグメントとは、抗体の抗原抗体反応活性を有するフラグメントを意味し、具体的には、 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab、Fv、及び組み換えFv体等を挙げることができる。

【0002】

【従来の技術】

多細胞生物は、その恒常性を保つために、細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体発生の過程では、多くの細胞が細胞死によって除去される。また、成体においても、臓器を構成する細胞は、常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。このような細胞死は、予め予定された死であり

“programmed cell death”とよばれ、物理的・化学的要因で引き起こされる不慮の死“accidental cell death”と区別されている。これらの2つの死は、その過程が異なっている。すなわち、プログラム細胞死は、アポトーシスの過程によって起こるのに対し、アクシデンタルな細胞死では、ネクローシス（壊死）の過程を経て細胞が死滅する。

【0003】

Fas抗原は、細胞死（アポトーシス）を媒介する細胞表面蛋白質である。最近、大阪バイオサイエンス研究所の伊藤直人博士・長田重一博士らの共同によりFas抗原のcDNAがクローニングされた（Cell, Vol. 66, p. 223-243, 1991）。得られたcDNAの構造から、ヒトFas抗原は、アミノ酸319残基からなる細胞膜貫通型蛋白質であり、1つの細胞膜貫通部分を有することが分った。Fas抗原の細胞外部分は、アミノ酸157残基から構成され、システイン残基に富む構造を有している。マウスFas抗原は、アミノ酸306残基からなり、ヒトFas抗原と49.3%の相同性を示す。

【0004】

Fas抗原における細胞外部分のシステイン残基に富む構造は、NGF（神経成長因子：nerve growth factor）の低親和性レセプターやTNF（腫瘍壊死因子：tumor necrosis factor）のレセプターにも認められるよく保存された構造であることが判明した。これらの事実から、Fas抗原が、NGF/TNFレセプターファミリーに属する細胞表層蛋白質であることが明らかとなった。このファミリーに属する蛋白質の多くは、生体内にそのリガンドを有しているので、Fas抗原にも生体内にリガンドが存在していることが予想されていたが、1993年大阪バイオサイエンス研究所の長田重一博士のグループによりラットのFasリガンドの分子が同定された（Cell, Vol. 75, p. 1169-1178, 1993）。続いて、マウス及びヒトのFasリガンドの分子が、同グループにより同定された（Int. Immunol., Vol. 6 No. 10, p. 1567-1574）。

【0005】

Fas抗原は、細胞に“死”というシグナルを伝えることが明らかになってい

る。抗Fas抗体は、ある種の細胞にアポトーシスを誘導する。また、自己免疫疾患様の症状を示すlpr (lymphoproliferation) 変異をもつマウスでは、Fas遺伝子に変異が存在していることが見出されている。これらの結果から、Fas抗原などのアポトーシスを媒介する蛋白質の不活性化が細胞の異常増殖を引き起こし、一方、その異常な活性化がある種の炎症反応を引き起こすことが示唆されている。

【0006】

このように、Fas抗原の研究によって、免疫系では、細胞の外から“死”というシグナルを伝える系が働いていることが証明されている。しかしながら、発生や神経細胞での細胞死は、同様に外からのシグナルにより誘導されているのか (Fasのシステムが働いているのか)、それともプログラム細胞死とよばれるように、細胞の中でプログラムされているのかは、未だに不明であり、その解明は、今後の大きな課題である。

【0007】

細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構、すなわち、Fas抗原からどのようなシグナル伝達機構によって、アポトーシスが誘導されるのかという問題も解明されていない。Fasのシステムを正確に理解するには、Fas抗原のリガンド (Fasリガンド) とその機能を明らかにし、リガンドとレセプターとの相互作用という観点からFasのシステムを見直す必要がある。

Fasリガントは、先述のごとく、長田重一博士らによりその遺伝子が同定された。その結果、前記“Cell”の文献によれば、Fasリガンドは、278個のアミノ酸からなる分子量31,138の蛋白質であること、また、4カ所のN-グリコシド結合サイトがあり、糖蛋白質であること等が判明している (細胞工学、Vol. 13 No. 8, p738-744, 1994)。

【0008】

また、Hanabuchiらの文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934, 1994) の報告によれば、キラーT細胞によるFas抗原を介した標的細胞破壊機構の解析の結果、パーフォリンを発現していないCD4⁺T細胞 (CTL) による標的細

胞破壊には、標的細胞上のFas抗原を介したアポトーシス・シグナルの伝達が関与している可能性が示され、それによってCD4⁺CTLの細胞表面にFasリガンドが存在していることが明らかになった。

さらには、自己免疫疾患様の症状を示すgld (generalized lymphoproliferative disease) 変異をもつマウスでは、Fasリガンドに変異が存在することが見い出されている (Cell, Vol. 76, p. 969-979, 1994)。

【0009】

しかし、現状は、Fasリガンドが生体の反応で重要であるのではないかとの認識がようやく得られたばかりである。このように、現在、Fasリガンドの分子が同定されたばかりであり、FasとFasリガンドの機序の解明の端についたばかりである。この機序を明らかにするには、蛋白質的（免疫化学的）解析、あるいはFasとFasリガンドの結合作用を阻害する中和抗体等の取得が必須となってくる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供することにある。

また、本発明の目的は、FasリガンドとFasとの生理的反応を阻害することができるFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を提供することにある。

【0011】

本発明の他の目的は、溶液中のFasリガンドを検出する方法、及びFasリガンド検出用キットを提供することにある。

本発明者らは、Fasリガンドに対するモノクローナル抗体を作製すれば、Fasのシステムの解析が進むのではないかと考え、鋭意検討を重ねた結果、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、及び該抗体を産生するハイブリドーマの取得に成功した。

さらに、F a s リガンドに特異的に反応する抗体等に関する研究を進め、その研究結果に基づいて、本発明を完成するに至った。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントが提供される。

また、本発明によれば、(1)動物を、F a s リガンドを発現させたC O S細胞で免疫感作する、(2)この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、(3)該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、(4)融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する、(5)ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、F a s リガンドを発現させたC O S細胞の上清中に存在するF a s リガンドによるF a s 発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、(6)所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウェル中の細胞群をクローニングする、(7)所望の抗体を分泌しているクローンを選択する、(8)再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する、(9)このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含むことを特徴とするF a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0013】

さらに、本発明によれば、細胞表面に存在するF a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、F a s リガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、溶液中のF a s リガンドを検出する方法、及びF a s リガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせるF a s リガンド検出用キットが提供される。

【0014】

以下、本発明について詳述する。

F a s リガンドとは、細胞死（アポトーシス）を媒介する細胞表面蛋白質である F a s 抗原のリガンドである。F a s リガンドは、その遺伝子の同定結果によれば、278個のアミノ酸からなる分子量31,138の蛋白質であることが判明している。現在までにヒト、ラット、及びマウスの F a s リガンドが同定されている。本発明では、広く F a s リガンドを対象とするが、これらの中でも、特に、種がヒト及びマウスの F a s リガンドが好ましい。すなわち、本発明は、好ましくは、ヒト F a s 抗原のリガンド及びマウス F a s 抗原のリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその活性フラグメントに関する。

【0015】

本発明のモノクローナル抗体は、F a s リガンドに特異的に反応するものであれば特に限定されないが、F a s リガンドと F a s との生理的反応を阻害することができるものであることが好ましい。ここでいう生理的反応を阻害することとは、F a s リガンドを発現している細胞が、F a s を発現している細胞に結合して、F a s を発現している細胞をアポトーシスにより死滅させるシグナルを与える時に、F a s と結合する F a s リガンドの結合部位に対し、特異的に結合し、F a s リガンドが F a s と結合できなくなるようにできる抗体（中和抗体）をさす。すなわち、F a s リガンドと F a s との生理的反応を阻害するモノクローナル抗体が存在すれば、F a s リガンドを発現している細胞が F a s を発現している細胞を死滅させることができなくなる。

【0016】

本発明の F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4（ハイブリドーマ N O K 1）、F E R M B P - 5 0 4 5（ハイブリドーマ N O K 2）、F E R M B P - 5 0 4 6（ハイブリドーマ N O K 3）、F E R M B P - 5 0 4 7（ハイブリドーマ N O K 4）、及び F E R M B P - 5 0 4 8（ハイブリドーマ N O K 5）として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から産生される各モノクローナル抗体を挙げることができる。

また、本発明の F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体として

は、例えば、クラスまたはサブクラスが、それぞれマウス IgG₁、マウス IgG_{2a}、マウス IgM、マウス IgG₃などのものが挙げられる。

【0017】

本発明の抗体は、免疫化学的な研究のみならず、免疫治療や診断などに有用である。このような目的を達成するには、必ずしも抗体分子全体を用いる必要がなく、活性を有する限り、分子の一部を用いることができ、場合によってはその方が好ましいこともある。このことは、当業者であれば容易に理解できることである。従って、本発明は、抗 Fas リガンド抗体の活性フラグメントをも包含するものである。抗体は、特定の抗原物質を認識する均一な免疫グロブリンである。活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味し、具体的には、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、及び組換え Fv 体などを挙げることができる。

【0018】

F(ab')₂ フラグメントは、免疫グロブリン IgG をペプシンを用いて消化することにより得られるフラグメントの1つである。IgG を pH 4.0 付近でペプシン消化 (pepsin digestion) すると、H鎖のヒンジ部で切断されて、分子量約10万のフラグメントを生成する。この切断は、H鎖間のジスルフィド結合よりもC末端側で起こる。このフラグメントは、抗原結合部位が2個あるので、抗原に結合して、沈降反応や凝集反応を起こすことができる。Fab' フラグメントは、F(ab')₂ フラグメントを2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると、H鎖間のジスルフィド結合が切断されて生じる分子量約5万のフラグメントである。

【0019】

Fab フラグメント (antigen-binding fragment) は、IgG をパパン消化 (papain digestion) することにより得られるフラグメントの1つである。IgG をシステインの存在下にパパン消化すると、ヒンジ部のH鎖間のジスルフィド結合よりN末端側の位置でH鎖を切断し、2個のFabと1個のFc (crystallizable fragment) を生成する。Fab フラグメントは、H鎖のH末端側の約半分に対応

するFdフラグメント (V_H ドメイン+ C_H1 ドメイン) とL鎖がジスルフィド結合した分子量約45,000のフラグメントである。Fabフラグメントは、抗原結合部位を1個有している。Fvフラグメントは、非共役結合で結合したH鎖可変部 (V_H) とL鎖可変部 (V_L) からなる抗原結合可能なフラグメントである。

【0020】

組換えFv体は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからDNAをシーケンスして、 V_H と L_H をコードする各塩基配列を決定し、次いで、これらのDNA断片をベクターに組み込んで、 V_L -Linker- V_H の構造を有する一価の抗体活性フラグメントを産生させることにより得ることができる。IgG、Fabまたは $F(a b')_2$ では、 V_H と L_H は、S-S結合により結合しているが、組換えFv体フラグメントでは、 V_H と L_H との間にリンカーを挿入して、S-S結合している状態と同様の立体構造がとれるようにしている。このフラグメントは、単にFvと呼ばれることがあり、また、SCFv (single chain Fv) とも呼ばれている。組換えFv体は、大腸菌等の微生物やバクテリオファージによって発現させることもできる。

【0021】

これらの活性フラグメントは、単独でも用いられるが、必要に応じて、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質と結合させ、新たな複合物として用いることができる。このような複合物は、一般に、生体内では、長時間分解されずにその効果を最大限まで発揮することが多い。活性フラグメントに、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質を付加する方法は、例えば、Antibodies, A. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されている。一般的には、SPDP (ファルマシア製) 等の2価反応性試薬を用いれば、活性フラグメントをアルブミン等と容易に結合させることができる。

また、例えば、マウス由来の活性フラグメントを用いて、H鎖とL鎖の相補性決定部以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置き換えるなどの方法により、ヒト化抗体を得ることもできる。

【0022】

本発明のモノクローナル抗体、及び該抗体を産生するハイブリドーマは、例えば、以下の方法により製造することができる。

(1) 動物(例、マウスなどの齧歯類動物)を、Fasリガンドを発現させたCOS細胞で免疫感作する。

(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する。主として、脾臓細胞やリンパ節細胞を用いるが、末梢リンパ球を用いてもよい。脾臓細胞を使用する場合には、この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

【0023】

(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する。例えば、該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤(例、ポリエチレングリコール)の存在下で混合して両細胞を融合する。電氣的処理により細胞融合させることもできる。ここで用いるミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なもの(例、8-アザグアニン耐性株)を用いる。

(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地中で培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別する。選択培地としては、例えば、8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞を用いた場合には、一般に、HAT培地(ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地)を用いる。

【0024】

(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する。

(6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクロー

ニングする。クローニングは、通常、限界希釈法により行う。

(7) 所望の抗体を分泌しているクローンを選択する。

(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する。

(9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス（例、ヌードマウス）腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する。

【0025】

より具体的に、本発明のモノクローナル抗体、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下の方法により製造することができる。

(1) Fasリガンド発現COS細胞の調製

ヒトFasリガンドの遺伝子は、S. NagataらのInt. Immunol. Vol. 6, No. 10, p. 1567-1574に記載の配列を参考にし取得することができる。具体的には、FasリガンドcDNAの5'末端側と3'末端側について相補的な各DNAプライマーを合成し、これらのプライマーをもとに、ヒトキラーT細胞から調製したFasリガンドを含むcDNAを鋳型にして、PCR法によりFasリガンド遺伝子の増幅反応を行った後、得られたcDNAをベクターPMK it Neoに導入した。このFasリガンド遺伝子導入ベクターをDEAE-デキストラン法にてCOS細胞(ATCC CRL 1650)に導入（トランスフェクション）し、ヒトFasリガンド発現COS細胞を調製した。

【0026】

(2) 免疫感作

Fasリガンドを発現しているCOS細胞を抗原として、齧歯類動物（例、MPL lpr/lprマウス）に免疫感作する。MPL lpr/lprを用いる理由としては、マウスをはじめとする齧歯類動物には、多くの組織でFasの発現がみられることを挙げることができる。そのため、マウスなどをFasリガンドを発現している細胞免疫原（＝抗原）として免疫感作すれば、Fasを介した死のシグナルが入り、動物個体を死に至らしめる結果となり、不都合である。

MPL lpr/lpr は、長田博士らの報告 (Nature, Vol. 356 p. 314-317, 1992) より明らかなように、機能を持ったFasを発現していない、そのため、MPL lpr/lpr マウスに、Fasリガンドを持つ細胞を接種しても死ぬことはなく、十分な免疫感作が可能となる。

【0027】

(3) この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を取り出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(4) 免疫感作したマウスの脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合促進剤 (例、ポリエチレングリコール) の存在下で混合して両細胞を融合する。ミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なもの (例、8-アザグアニン耐性株) を用いる。

(5) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地 (例、HAT培地) 中で培養することにより、目的とするモノクローナル抗体を産生する細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選択培養する。

【0028】

(6) ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害すること、すなわち、キラー活性をブロックすることを指標にして、抗体の存在を確認する。具体的には、ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、先ず、Fasリガンドと反応させる。次いで、ターゲットとしてFas抗原を細胞表面に発現するトランスフェクタントを用い、Fasリガンドのキラー活性をブロックするか否かを調べ、キラー活性をブロックした培養上清のハイブリドーマを選択する方法がある。

(7) 所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択した後、限界希釈法により単一クローンにする。

(8) その単一クローンの培養上清液からモノクローナル抗体を回収する。

【0029】

本発明のモノクローナル抗体は、F a s リガンドと特異的に反応するため、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構やF a s システムを解明するのに役立つことができる。また、本発明のモノクローナル抗体及びその活性フラグメントは、免疫治療や診断、及びこれらに関連した産業分野において有用である。例えば、F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を血液中の細胞と反応させ、蛍光標識の2次抗体をさらに結合させ、フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡で測定すれば、F a s リガンドがどの細胞に発現しているかを見極めることができる。本発明のモノクローナル抗体をF I T CやP Eなどの蛍光色素に結合させることは、常法により容易に行うことができる。したがって、本発明のモノクローナル抗体及びその活性フラグメントは、例えば、診断用の試薬として有用である。

【0030】

種々の疾患（例えば、自己免疫疾患、リウマチ、肝炎など）の患者から取り出した組織等に対し、本発明のモノクローナル抗体を反応させることにより、F a s リガンドを発現している細胞が組織のどこに存在しているのかを調べることができる。

本発明のモノクローナル抗体を複数（例えば、2種類）組み合わせて用いることにより、溶液（血液、培養上清液、体液、尿液など）中のF a s リガンドを検出（さらには定量）することができる。また、複数（例えば、2種類）のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、F a s リガンド検出用キットを得ることができる。

【0031】

【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例のみに限定されるものではない。

〔実施例1〕モノクローナル抗体の作製及び特性化

（1）F a s リガンド遺伝子の単離

①プライマーの調製

ヒトF a s リガンドの遺伝子は、N a g a t a e t. a l. の報告をもとに

単離した。すなわち、ヒトFasリガンドcDNAの5'末端側では、Xho-Iサイトの配列にヒトFasリガンド5'末端の配列18merを付加したXho-I-5'FasL、ヒトFasリガンドcDNAの3'末端側では、NotIサイトの配列にヒトFasリガンド3'末端の配列18merを付加したNotI-3'FasLのそれぞれについて、モデル392DNA/RNAシンセサイザー（ABI製）を用いて0.2μmolのスケールでDNA合成を行った。プロトコールに従い生成DNAを精製して、PCR用のプライマーとした。

【0032】

②FasリガンドcDNAの鋳型の調製

鋳型は、ヒトFasリガンドを発現しているヒトキラーT細胞から調製した。具体的には、ヒトキラーT細胞をPMAとイオノマイシンで活性化し、この細胞を 1×10^7 個回収した。回収した細胞は、RNAzolB（コスモバイオ製）1mlに懸濁し、さらに100μlのクロロホルムを加えてよく混合した後、氷上にて30分間放置した。その後、15,000rpm、15分間の遠心分離（4℃）にて、フェノール層と水層とに分け、上層の水層のみを回収した。これに対して等量のイソプロパノールを加え、-80℃にて30分間放置し、遠心分離（15,000rpm、15分間、4℃）でRNAを沈殿させた。この沈殿をエタノール1mlで1回遠心洗浄した後、DEPC処理した水11.5μlに懸濁した。このRNA液11.5μlに対し、合成のオリゴdTを0.5μl（0.5mg/ml）加え、70℃にて10分間熱処理を行った。その後、氷上にて5分間処理した。

【0033】

その後、5×RT緩衝液（ストラタジーン製）4μlと10mMのdNTP1μlと0.1MDTT2μlとSuperscript RTase（ストラタジーン製）1μlとを加え、42℃で50分間反応させ、cDNAへと逆転写させた。90℃で5分間処理し、RTaseを失活させた後、氷上に5分間放置した。次に、このサンプルにRNaseH（ストラタジーン製）1μlを加え、さらに37℃で20分間反応させて不要なRNAを分解した後、これをFasリガンドを含むcDNAの鋳型とした。

【0034】

③PCR

PCRは、PCR実験マニュアル（HBJ出版、p. 75～85）を参考に、次の条件で実施した。

すなわち、②で作製したcDNA 2 μ lに対し、10mMのdNTPmix（ファルマシア製）1 μ l + Xho I サイト-5' ヒトFas L 18mer（50 μ M）1 μ l + Not I -3' ヒトFas L 18mer（50 μ M）1 μ l + 10 \times のPCR緩衝液（パーキンエルマー製）4 μ l + Ampli Taq TM（パーキンエルマー製）0.5 μ l + 水30.5 μ lでトータル40 μ lにし、これにミネラルオイル（シグマ製）40 μ lを重層した後、PCR用のDNAサーマルサイクラー（パーキンエルマー・ジャパン製）を用いて増幅反応を行った。具体的には、順次、94℃5分間、55℃2分間、72℃3分間、94℃1分間、55℃2分間、及び72℃10分間の条件で、かつ、55℃2分間と94℃1分間との間の処理を30回繰り返すことにより増幅反応を行った。

【0035】

④PMK i t N e oベクターへの組み込み

PCRにて増幅反応を行った後、フェノールとクロロホルムの混合液で水層のみを抽出した。この液に、Xho IとNot I（いずれもベンリンガー社製）各1.0単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて16時間反応した。この液について、1%アガロースゲル電気泳動を行った。UV照射のもとで、Fasリガンドに相当する約850bpのバンドを切り出した。

このアガロースゲルから、GENECLEAN IIキット（BIO101、フナコシ製）を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスミルク（glass milk）を加え5分間ローテートし、DNAを吸着させた。このグラスミルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液10 μ lに懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。

【0036】

次に、PMK i t N e oベクターも1 μ g分、同様に、Xho IとNot Iで

制限酵素処理を行い、0.75%アガロース電気泳動した後、GENECLEAN IIキットを用いて精製した。

次に、FasリガンドcDNAとPMKittNeoベクターをライゲーションした。すなわち、ベクター：cDNA=1：2（モル比）になるように混合し、これに宝酒造製のDNAライゲーションキットを用いて、16℃にて16時間ライゲーション反応を行った。

【0037】

⑤大腸菌への組み込み

前記④の反応液を、大腸菌コンピテントセル（東洋紡製）と混合して、氷上で30分間、42℃で40秒間インキュベートすることにより、DNAを大腸菌へ導入した。これに対し、SOC培地を加え、37℃で1時間振とう培養後、アンピシリン入りのLB寒天培地に分注し37℃にて1日間培養した。その後、出現したコロニーをLB培地で37℃1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド（ヒトFasリガンド-PMKittNeo）を回収した。

【0038】

(2) COS細胞への導入

プラスミド（ヒトFasリガンド-PMKittNeo）のCOS細胞（ATCC CRL1650）への導入は、DEAE-デキストラン法（実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現解析法、p.16-22、1994、羊土社）により行った。すなわち、アルマシア製のDEAE-デキストランを用い、ヒトFasリガンド-PMKittNeo 5 μ g/2 \times 10⁶COS細胞の割合でDEAE-デキストラン法を実施し、Fasリガンド発現COS細胞を得た。

【0039】

(3) 免疫感作

前記(2)で調製したFasリガンド発現COS細胞の懸濁液をMPL 1pr/1prマウス（メス、4週齢）の腹腔内に、1 \times 10⁷個（細胞）/匹の割合で注射した。次いで、1週間後から週1回の割合で合計3回、同一マウスにFasリガンド発現COS細胞の懸濁液を注射することにより、免疫感作した。

【0040】

(4) 細胞融合

最終免疫の3日後に、上記マウスから脾臓を取り出した。脾臓を細断後、メッシュで濾過し、RPMI 1640培地（日水製）に浮遊させ、脾細胞 1×10^8 個を得た。この脾細胞とマウス由来の8-アザグアニン耐性株（ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株）P3X63Ag8.653（ATCC CRL1580）（ 1×10^7 個）と約5:1の割合で混合し、遠心した（1500rpm、5分間）。

【0041】

得られた細胞のペレットに、50%ポリエチレングリコール4000（メルク製）/RPMI 1640溶液2mlを、37℃の温水中で攪拌しながら1分間を要して加えた。これにRPMI 1640液15mlを攪拌しながら6分間を要して加え、細胞融合を行った。融合後、大量（約40ml）のRPMI 1640液を加え、遠心分離（1500rpm、5分）して上清を除去した。次いで、ヒポキサンチン（100 μ M）、アミノプテリン（0.4 μ M）、チミジン（10 μ M）を含む10%FCS（牛胎児血清）-RPMI 1640培地（HAT培地）にて、脾細胞が 1×10^6 個/mlになるように調製した。

【0042】

(5) ハイブリドーマの選択

上記（4）で調製した細胞浮遊液を96ウェルマイクロプレート10枚に200 μ lずつ分注し、37℃、5%CO₂下にあるCO₂インキュベータで細胞を培養した。1週間後には、ハイブリドーマのみがコロニーを形成して、増殖していることが確認できた。

【0043】

(6) ハイブリドーマの選別

エフェクター分子として、Fasリガンドを発現したCOS細胞の培養上清を使用し、かつ、ターゲットとしてFas抗原を細胞表面に発現するトランスフェクタントを用い、COSの培養上清中に存在する可溶性Fasリガンド分子のトランスフェクタントに対するキラー活性をブロックした培養上清のハイブリド-

マを選別した。

【0044】

①可溶性Fasリガンド分子の調製

Fasリガンド分子は、Fasリガンド発現COS細胞の培養上清に存在する可溶性Fasリガンド分子を使用した。すなわちCOS細胞にDEAE-デキストラン法にてFasリガンド-PMKITNeoを導入後、10%FCS-DMEM培地100ml分用いて1週間培養した後、その培養上清を回収した。これを0.45 μ mのフィルターで滅菌し、これを可溶性Fasリガンド分子とした。

【0045】

②ターゲット細胞の調製

ターゲット細胞には、ヒトFas遺伝子を導入したWR19L細胞を用いた。WR19L(ATCC TIB52)へのヒトFas遺伝子の導入は、常法に従って行った。具体的には、Hanabuchiらの文献(Proc. Natl Acad Sci USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934, 1994)を参考にして作製した。得られたFas-WR19L細胞を培養し、10%FCS・RPMI培地にて 2×10^5 個/mlに調製した。

【0046】

③スクリーニングアッセイ

まず、①で調製した可溶性Fasリガンド分子を10%FCS-DMEM培地で12倍に希釈した。96ウェル平底プレート(コーニング製)を用い、各ウェルに、この希釈液25 μ lに対し、各ハイブリドーマの培養上清を25 μ l加え、37℃で1時間インキュベートした。その後、②で調製したFas-WR19L細胞を50 μ l/ウェル加え、37℃で5%CO₂の環境下のもと、12時間インキュベートした。

次いで、Almar Blue TMアッセイキット(関東化学)を用いて生細胞率を測定し、可溶性Fasリガンド分子によるFas-WR19L細胞に対するキラー活性を阻害しているウェルのハイブリドーマを選択した。

【0047】

(7) クローニング

抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を、限界希釈法により1個／ウェルとなるように、96ウェルマイクロプレートに分注し、培養した。10日間の培養後、シングルコロニーの増殖が確認できたため、再び、キラー活性のブロックによる抗体検出の操作を行った。その結果、Fasリガンドと特異的に反応するクローンを得た。次いで、単一クローンのハイブリドーマの培養上清液から抗体を回収することにより、目的とするFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。

上記で得られたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、NOKと命名されて、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044 (NOK1)、FERM BP-5045 (NOK2)、FERM BP-5046 (NOK3)、FERM BP-5047 (NOK4)、FERM BP-5048 (NOK5) などとして寄託されている細胞株を例示することができる。

【0048】

(8) モノクローナル抗体の特性化

特性化① (FasL発現細胞の染色)

得られたハイブリドーマの中で例えばNOK5の細胞株が産生する抗体が、細胞表面に発現するFasリガンドと反応することを、Fasリガンドを発現させたL5178Y細胞をもととの親株であるL5178Y細胞(ATCC CRL1723)と比較することで検討した。

L5178Y細胞は、それぞれPBSで 1×10^6 個／mlに調製した。チューブ（ファルコンNo. 2008）にこの細胞を 1×10^6 個ずつ入れた。次いで、ハイブリドーマNOK5の培養上清100 μ lを入れ、水上で30分間反応させた。次いで、PBSで遠心洗浄（1500rpm、1分間、2回）し、FITC-抗マウスIg' s（コスモバイオ／カペル製）1 μ lを加え、さらに水上で20分間反応させた。反応後、PBSで2回遠心洗浄を行い、PBS200 μ lに懸濁した後、FACScanにて測定した。

【0049】

その結果、図1～3に示すように、NOK5が産生する抗体は、Fasリガン

ドを発現したL5178Y細胞には反応するが、親株のL5178Y細胞には反応しないことが明らかになった。即ち、図2と図3に示すように、親株のL5178Y細胞の染色パターンは、NOK5抗体の添加の有無によって相違することはないが、図1に示すように、Fasリガンド-L5178Y細胞の染色パターンは、NOK5抗体の添加の有無によって明瞭に相違している。

NOK1ないしNOK4の細胞株を用いて、前記NOK5の場合と同様の結果を得た。

【0050】

特性化②（サブクラスの測定）

NOK1ないしNOK5のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体について、サブクラスを測定した。

サブクラスの測定は、MABタイピングキット（PharMingen社製）を用い、付属のプロトコールに従い測定したところ、それぞれ、NOK1は、マウスIgG₁、NOK2は、マウスIgG_{2a}、NOK3は、マウスIgM、NOK4は、マウスIgG₃、NOK5は、マウスIgG_{2a}であった。

【0051】

特性化③

前記したとおり、Almar Blue TMアッセイキット（関東化学）を用いて生細胞率を測定し、可溶性Fasリガンド分子によるFas-WR19L細胞に対するキラー活性を阻害しているウエルのハイブリドーマを選択したが、NOK1～NOK5のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体は、下表に示すごとく、前記（6）①～③に記載の方法で実施すれば、可溶性FasリガンドによるFas-WR19L細胞に対するキラー活性を、98%以上の高率で阻害する。

【0052】

【表1】

クローン	生存率
抗体無添加	3.5 %
NOK1 培養上清添加	99.3 %
NOK2 培養上清添加	105.2 %
NOK3 培養上清添加	101.0 %
NOK4 培養上清添加	109.8 %
NOK5 培養上清添加	98.2 %

【0053】

【発明の効果】

本発明のFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、Fasリガンドに特異的に反応することから、例えば、Fas抗原とそのリガンドとの相互作用の解析を行うことにより、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構やFasのシステムを解明することができる。

本発明のFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、免疫治療や診断、及びこれらに関連した産業分野において有用である。すなわち、Fasリガンドに対する抗体を血液中の細胞と反応させ、蛍光標識の2次抗体をさらに結合させ、フローサイトメトリーあるいは蛍光顕微鏡で測定すれば、Fasリガンドがどの細胞に発現されているかを見極めることができる。Fasリガンドに対するモノクローナル抗体をFITC、PEのような蛍光色素に結合させることは容易であり、したがって、2次抗体を使用せずに解析することができるため、診断や基礎研究の分野で非常に有用である。

【0054】

種々の疾患（例えば、自己免疫疾患、リウマチ、肝炎など）の患者から取り出した組織等に対し、本発明のモノクローナル抗体で反応させて、Fasリガンドを発現している細胞が組織のどこに存在しているかを調べることができる。これにより、各種疾患の診断や治療へつなげることが可能となる。Fasリガンドに対するモノクローナル抗体は、Fasリガンドの反応（結合）を阻害することから、肝炎やリウマチ等の疾患の治療に有用なものとなる。また、本発明のモ

ノクローナル抗体から、抗体産生遺伝子を合成し、F a s リガンドとの結合にかかわる部分のみをヒトの I g G 型の抗体に移植すれば、ヒト型抗体を得ることができ、上述の多くの疾患の治療に有用となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、F a s リガンドーL5178Y細胞の染色パターンを示すF A C S c a nチャートである。

【図2】

図2は、L5178Y親株のNOK5抗体無添加の場合の染色パターンを示すF A C S c a nチャートである。

【図3】

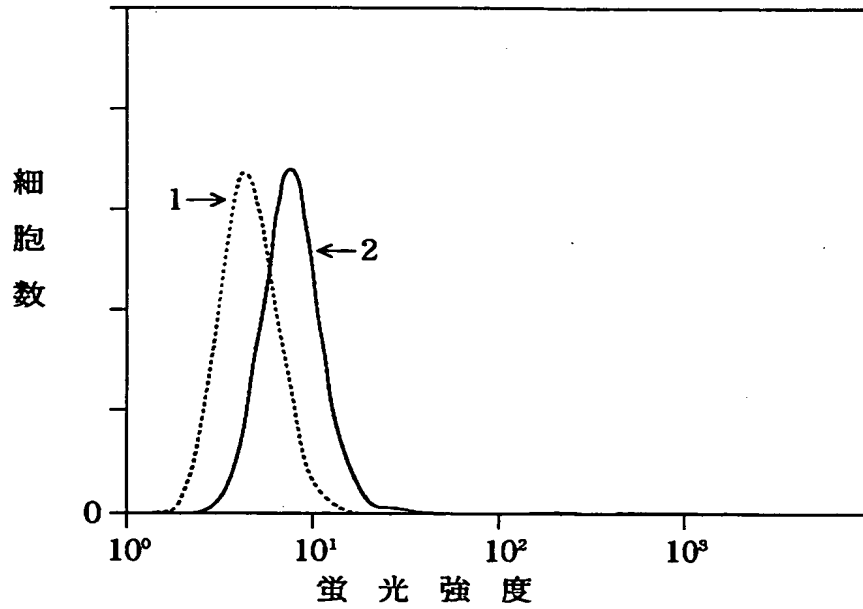
図3は、L5178Y親株のNOK5抗体添加の場合の染色パターンを示すF A C S c a nチャートである。

【符号の説明】

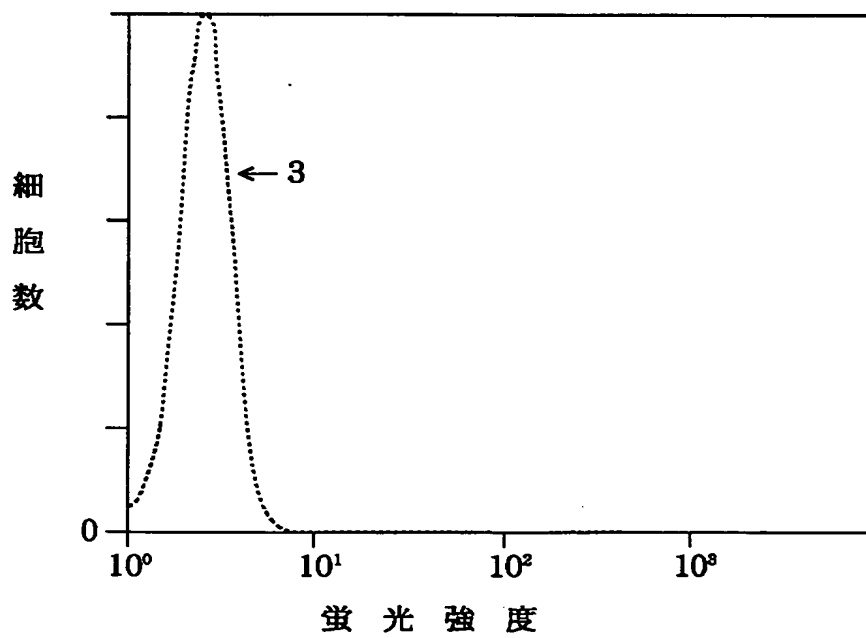
- 1 : NOK5抗体なし
- 2 : NOK5抗体添加
- 3 : NOK5抗体なし
- 4 : NOK5抗体添加

【書類名】 図面

【図1】

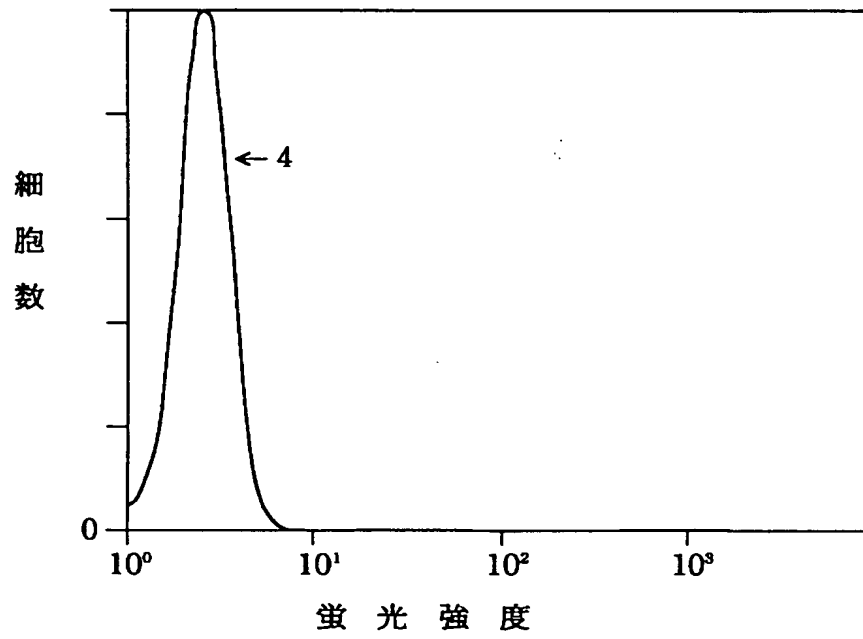


【図2】



【図3】

特平 7-087420



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 細胞表面に存在するF a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、溶液中のF a sリガンド検出方法F a sリガンド検出用キット、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供すること。

【構成】 F a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。マウスなどの動物を、F a sリガンドを発現させたC O S細胞で免疫感作する工程を含むF a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法。F a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。溶液（血液、培養上清液、体液、尿液）中のF a sリガンド検出方法、及びF a sリガンド検出用キット。

【選択図】 なし



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約 〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 住友電気工業株式会社
代表取締役 倉内 憲孝

寄託者 あて名 ⑤ 541 殿
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK1	(受託番号) FERM BP- 5044
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国寄託当局は、平成 7 年 3 月 20 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Science and Technology 所長 鈴木 修 Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 7 年 (1995) 3 月 20 日	

特平 7-087420



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約 〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 住友電気工業株式会社
代表取締役 倉内 憲孝
寄託者 あて名 ⑤ 541 殿
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK 2	(受託番号) FERM BP- 5045
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7 年 3 月 20 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology 所長 鈴木 修 Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 7 年 (1995) 3 月 20 日	



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約 〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 住友電気工業株式会社
代表取締役 倉内 憲孝
寄託者 あて名 〇 541 殿
大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番 3 3 号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK3	(受託番号) FERM BP- 5046
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7 年 3 月 20 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 所長 鈴木 修 Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 7 年 (1995) 3 月 20 日	



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約 〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 住友電気工業株式会社
代表取締役 倉内 寛孝
寄託者 あて名 ⑤ 541 殿
大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番 3 3 号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK4	(受託番号) FERM BP- 5047
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7 年 3 月 20 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 所長 鈴木 修 Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305. JAPAN	
平成 7 年 (1995) 3 月 20 日	



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 住友電気工業株式会社
代表取締役 倉内 憲孝
寄託者 あて名 ⑤ 541 殿
大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番 3 3 号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK5	(受託番号) FERM BP- 5048
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7 年 3 月 20 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human-Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 鈴木 修 Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県 1-3. Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305. JAPAN	
平成 7 年 (1995) 3 月 20 日	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002130

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

【氏名又は名称】 住友電気工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093528

【住所又は居所】 東京都荒川区東日暮里3丁目43番8号 ビジュー
アル・シティー401号

【氏名又は名称】 西川 繁明

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 原寄託についての受託証 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 {000002130}

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

氏 名 住友電気工業株式会社

